

METHOD AND DEVICE FOR OPTICALLY CONFIRMING PARAMETER OF SEEDIN LIQUEFIED MATERIAL TO BE ANALYZED**Publication number:** JP61191965 (A)**Publication date:** 1986-08-28**Inventor(s):** RANARUDO EMU SUTERURANDO; KUROOSU DANE;
JIYORUJIE RUBIRE**Applicant(s):** BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE**Classification:****- International:** G01N21/27; G01N21/64; G01N21/77; G01N33/543;
G01N21/25; G01N21/64; G01N21/77; G01N33/543; (IPC1-
7): G01N21/27; G01N33/543**- European:** G01N21/77B; G01N33/543K2**Application number:** JP19850278144 19851210**Priority number(s):** EP19840810800 19841210**Also published as:** JP2603611 (B2)
 EP0184600 (A1)
 EP0184600 (B1)
 US4818710 (A)
 CA1272617 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 61191965 (A)

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

⑩ 公開特許公報(A) 昭61-191965

⑨ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑨ 公開 昭和61年(1986)8月26日

G 01 N 33/543
21/27
33/543

J-7906-2G
C-7458-2G
D-7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全20頁)

⑨ 発明の名称 液状分析物中の種のパラメーターを光学的に確認する方法および装置

⑨ 特 願 昭60-276144

⑨ 出 願 昭60(1985)12月10日

優先権主張 ⑨ 1984年12月10日 ⑨ 欧州特許機構(E.P.) ⑨ 84810600.1

- ⑨ 発 明 者 ラナルド エム. ステ スイス国, 1207 ジュネーブ, リュ デュ 31 デセンプ
ルランド ル, 32
- ⑨ 発 明 者 ク ロ ス グ ネ スイス国, ジュネーブ, 1213 オネ, アブニユ デュ ボ
ワードウーラーシャベル, 103
- ⑨ 発 明 者 ジョルジェ ルビレ スイス国, ジュネーブ, 1213 オネ, ツエーハー, フラン
ソワーズ シャバ, 20
- ⑨ 出 願 人 バテル メモリアル アメリカ合衆国, オハイオ, コロンブス, キング アベニ
ンステイチユート ュ 505
- ⑨ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明細書の添付(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

液状分析物中の種のパラメーターを光学的に確認する方法および装置

2. 特許請求の範囲

1. 液状分析物におけるパラメーターを確認する方法、例えば、溶液中の種を決定する方法であって、ここで内部で反射する光の信号のエバネッセント成分が、前記分析物と前記信号の導波路との界面において、前記種の1つおよび前記導波路の表面に取り付けられた前記種の1つに対して特異性の試薬から構成された複合体の層および/または前記分析物の本体と相互作用し、こうして前記パラメーターを表わす光エネルギーの出力の変化を提供し、前記方法は前記出力エネルギーを集めそしてそれを光電子工学的に処理して前記パラメーターに対応する親出しアラームにすることを含み、

a) 前記導波路内の前記光の信号の反射角を制御して、前記エバネッセント成分を前記複合体

の層を越えて前記溶液の本体中に浸透させ、前記浸透の深さは、前記複合体の層および前記分析物の本体の両者に対して応答性とし、こうして前記複合体の層中の第1種を表わすパラメーターならびに前記溶液中の第2種を表わすパラメーターについて処理可能な出力エネルギーを同時に提供するために十分であり、あるいは

b) 前記導波路の2またはそれより多い区域を使用し、1つの第1区域はそれに取り付けられた第1試薬を保持して決定すべき第1種の複合体の層を提供し、これにより前記相互作用は前記複合体の層に対してのみ応答性であり、そして出力はこの第1種のパラメーターのみを表わし、そして第2区域は、

(b1) 種であるあるいは遮断されており、これにより前記相互作用は前記分析物の本体に対して応答性でありかつその中に溶解した第2種のパラメーターを表わし、あるいは

(b2) 第2種に対して特異性の第2試薬で被覆されており、こうして第2複合体の層を提供し、

この層に対して前記相互作用は応答性であり、そして出力は他のパラメーターを喪失し、後者のパラメーターは前記第2層に係属し、

e) 混合された信号から成る出力を処理し、そしてそれを問題の各パラメーターに対して特異性の成分に分割し、

4) 前記成分を別々のデータに表わし、そして

b) 前記表示されたデータを対応するパラメーターが知られている標準溶液から得られた標準データと相互に関係づけることによって、前記パラメーターを確認する、
ことを特徴とする方法。

2. 前記導波路内の励起光を内部の多重反射により伝送し、そしてこの信号と前記分析物との相互作用は蛍光のある強度の吸収、および/または、散乱および/または発生を含む特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 前記導波路は光学的スライドまたはフィルムから成り、複合体の層が分析の間にその表面に形成し、こうして前記第1層について時間依存

モグロビン(Ag)を前記合計のヘモグロビンに關して、実質的に同時に決定する特許請求の範囲第1項記載の方法であって、この方法は、次の工程:

a) 分析すべき試料の屈折率(n_s)より大きい屈折率(n_f)の光学的導波システムの表面の少なくとも一部を、複合化試薬(Ab)の1または2以上の被膜で被覆し、前記被膜の各々は前記ヘモグロビンAgの因子またはその誘導体に対して特異性でありかつ前記Agと反応したとき前記複合体の層を形成することができる試薬であり、

b) 前記導波システムを入力端において光線で照明し、そして出力端において出る光を集め、前記光線は前記導波システムに沿って角度 θ で多重内部反射機構により伝送され、こうして前記光線の伝送に關連する消散光成分の導波システムの外側の作用の有効範囲は前記複合体層のそれを越え、

c) 分析すべき前記血液試料および前記照明された導波システムを一様に接触させ、これにより、一方において、前記導波システム内を移動する光の部分は前記エバネッセント波成分と全体の試料

性の応答を提供しかつ前記第2層について即時の応答を提供する特許請求の範囲第2項記載の方法。

4. 前記導波路の前記2つまたはそれより多い明確な区域は同一の入射光の信号により付勢される特許請求の範囲第2項記載の方法。

5. 前記導波路の前記2つまたはそれより多い明確な区域の各々は別々に照明される導波路の素子を含む特許請求の範囲第2項記載の方法。

6. 前記導波路は分析用キャベットにより構成されており、その対向する壁は独立に別々に照明される素子として作用する特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. 出力に集められた前記混合された信号は波長が同一であるかあるいは異なる成分からなる特許請求の範囲第3~5項のいずれかに記載の方法。

8. 前記明確な区域の照明は交互に実施される特許請求の範囲第5項記載の方法。

9. 血液試料中の合計のヘモグロビン(Hb)および、選択的に任意に、それ以上のヘモグロビン因子またはその誘導体、例えば、グリコシル化ヘ

モグロビンとの相互作用により最初に吸収され、これにより前記出力端から出る光において瞬間的な鋭い低下(I)が生じ、そして、他方において、前記血液試料中の決定すべき前記グリコシル化ヘモグロビンまたは他の因子と前記複合体層が連続的に蓄積している前記導波システム上に被覆された対応するAbとの間に免疫型反応が発生し、このような発生は前記出る光に比較的時間遅い変化を生じさせ、前記比較的時間遅い変化は前記エバネッセント波成分と形成しつつある前記複合体層との相互作用のためであり、

4) 前記出力端から集められる伝送光に対して起こる前記急激な光学的吸収の低下(I)を観測、測定および/または記録し、前記測定された低下は前記試料の合計のヘモグロビンHbの濃度に定量的に關係づけられ、

c) 前記比較的時間遅い変化を観測、測定および/または記録し、その大きさ(M)および速度(K)は前記試料中のグリコシル化ヘモグロビンまたは他の因子Agの量に定量的に關係し、

f) 必要な計算を、例えば、電子工学的に、実施して、I および M または K の値から得られた結果を前記試料中の Hb の濃度および/または Ag 対 Hb の比で表す、からなる方法。

10. 工程(a)および(b)の双方を、抗体 Ab をその上に被覆して有する導波路の区域における、入射光と分析物との相互作用から得られる信号について実施する特許請求の範囲第9項記載の方法。

11. 工程(a)を抗体 Ab で被覆されていない導波路の部分における前記相互作用から得られる出力の成分について実施する特許請求の範囲第9項記載の方法。

12. 二重型の導波路を使用し、その1つの部分は抗体 Ab で被覆されており、そしてその他の部分は抗体で被覆されていない特許請求の範囲第11項記載の方法。

13. 前記他の部分は遮断性タンパク質で被覆されていて、導波路の被覆されていない表面区域へのヘモグロビンの起こりうる付着を最小とされて

な入力端の中に入れる光源手段、

b) 前記導波路の出力から出る光の信号を集めかつ前記相互作用を表わす電気信号を発生する光検出手段、

e) 前記電気信号を処理しかつ前記所望の決定に関する適当な脱出しを提供する計算手段、からなり、

前記特異性試薬の被膜は前記導波路の操作区域の一部のみを含み、その残部は裸であるかあるいは遮断剤により前記因子の結合に対して阻止性とされていること、および前記導波路の前記試薬で被覆された区域は決定すべき前記特異性因子に対して応答性とされており、これに対して前記被覆されていないかあるいは遮断されている区域は前記合計のヘモグロビンに対して応答性であることを特徴とする装置。

16. 前記導波路は二重型構造を有しかつ前記光学信号を同時にあるいは交互に運搬する2つの独立の光学的素子からなり、前記素子の一方は反応成分で被覆されており、そして他方は裸であるか

いる特許請求の範囲第12項記載の方法。

14. 二重導波路として、分析用キャベットを使用することを含み、前記導波路の主要な対向する壁は光伝送性であり、そして血液試料の屈折率(n_s)より大きい適当な屈折率(n_i)の透明材料から作られており、この材料は導波路としてはたらく特許請求の範囲第12項記載の方法。

15. 血液試料中の合計のヘモグロビンを少なくとも1種の他の特定のヘモグロビン因子と一緒に光学的手段により導波路を使用して同時に決定する装置であって、前記導波路は決定すべき前記種と相互作用しかつ前記種を表わす検出可能な応答を提供することができる光の信号を運搬し、前記相互作用は前記導波路内を移動する光の信号のエバネッセント波成分と前記試料の本体または複合体との相互作用であり、前記複合体は前記因子と前記導波路の被覆により取り付けられた前記因子に対して特異性の試薬との結合から生じ、この装置は、

a) 光線を発生しかつそれを前記導波路の適当

あるいは遮断されている特許請求の範囲第15項記載の装置。

16. 導波路として、光学的セルまたはキャベットを使用し、その2つの対向する壁は前記導波素子として作用する特許請求の範囲第16項記載の装置。

17. 前記光源手段は前記二重型導波路の2つの素子の中に信号光を交互に注入するチャッパ手段からなる特許請求の範囲第17項記載の装置。

18. 前記チャッパ手段は回転鏡またはチャッパディスクである特許請求の範囲第18項記載の装置。

19. 前記光源手段は2つの独立の交互に閃光する光源からなり、その出力は各々ビームスプリッティング手段を経て前記素子の一方の光学的端へ収束され、そして前記素子の他方の端は完全に反射性とされており、これにより前記素子により運ばれる光の信号はその内部を前後に移動する特許請求の範囲第16項記載の装置。

以下余白

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は性状分析物(analyte)中のパラメータを確認する方法、例えば、その中に溶解した種を決定する方法に関する。

〔従来の技術と発明が解決しようとする問題点〕

この方法は既知の技術に關し、ここで完全に反射した光の信号を運ぶ光学的導波路(waveguide)は分析物と接触し、そして前記信号のエバネッセント波成分は固体と液体との界面において分析物と、その内部の種に固有のあるパラメータに対して応答性であるような方法で相互作用する。例えば、このようなパラメータについての情報は、導波路内に入射信号の反射点における入射信号の視感エネルギーの一部の吸収に關し、あるいはこのような種に特徴的な蛍光信号の連続的生成を伴う前記視感エネルギーによるある蛍光発生体(fluorophore)の励起に關係づけることができる。一般に、相互作用は入射光のエバネッセント波成

分が分析物中に浸透する深さに対応する区域に限定され、この深さは導波路の表面から出発して数十〜数百ナノメートルの範囲である。

前述の相互作用は全体の溶液中のあるパラメータについて情報を提供することが一般に知られている〔ハーディ(Hardy)、米国特許4,050,895号〕が、最近発表された研究が示すように、エバネッセント波成分と分析物との相互作用(あるいはむしろ、そのエネルギーの実質的な部分の分析物中への漏れ)が導波路の表面と結合した問題の化合物の単一層(一般に単分子層)を含むように限定されるとき、改良された結果(すなわち、すぐれた感度および精度)が得られる。換言すると、非常に有用な分析技術は、研究すべき分析物との接触前に、導波路上に前記分析物の種に対して特異性の反応成分を取り付け、その後、それを前記分析物中に浸透させることに基づいてことができることが最近発見された。これらの条件下で、問題の種は前記反応成分と結合し、そして導波路の表面に複合体(complex)の層を形成し、問題の種の

その層中の濃度(すなわち、相互作用の区域における前記種の実際の密度)は時間とともに非常に急速に増加し、そして導波路内を移動する光との相互作用は増加しかつその出力における応答は強くなるであろう〔クロニク(KRONIK)およびリトル(LITTLE)、米国特許3,939,350号〕。

導波路の表面上の問題の生成物の非常に薄い層の形成を含むこのような型の分析において、光の信号と溶液の本体との相互作用は妨害(バックグラウンドの雑音)と考えられており、そしてそれを行えるだけ多く最小とする試みがなされてきた。例えば、エバネッセント成分と導波路の表面上に付着した単分子層との最大の相互作用および全体の溶液との最小の相互作用の間の妥協的条件は、導波路/分析物の界面における導波路の材料の外側の前記エバネッセント成分の浸透深さを制御することによって達成できる。このような制御は、溶液の屈折率(n_1)に關して適当な屈折率(n_2)をもつ導波路を選択し、そして導波装置内の全体の反射角ならびに入射光の波長を適切に選ぶこと

によって実施できる(これを実施できる理由およびこのような選択を行う方法については後に詳述する)。例えば、欧州特許出願(EPA)75353号において、この浸透深さは問題の前記層の厚さに合致するように、あるいはそれを超えるように最適化できることが開示されている。

〔問題点を解決するための手段および作用効果〕

しかしながら、このアプローチは常に最も望ましいということはないことが予測せざるには今回発見された。事実、問題の層の厚さに相当する距離を明確に感えるエバネッセント波成分の浸透は、問題の前記層中に特定の含まれるもの以外の分析物のパラメータ、例えば、分析物中に溶解した種についての分析結果を同時に得るとき、きわめて有用でありうることが発見された。したがって、この発見は特許請求の範囲第1項に記載される新規な分析法の1つの面に準拠した。その上、この方法は、また、導波路が運ぶ光と分析物との有用な相互作用が導波路の1つより多い特定の区

域(すなわち、この区域上の単一層の被膜または全体の溶液との相互作用、あるいは全体溶液および被膜の両者の同時の相互作用が起こる区域)を含むことができ、すなわち、前記導波路の2つまたはいくつかの明確に異なる区域を含むことができるということを認識した後、それ以上の面に拡張された。例えば、1つの区域において、相互作用は全体の溶液と起こり、そして他のあるいはさらに多い光学的に分離された区域において、相互作用は問題の1つまたはいくつかの層と起こるのである。特許請求の範囲第1項は、本発明のこの方法の完全な範囲を實際に要約している。

本発明の方法において、導波路内を案内される光と分析物との任意の型の相互作用を考慮することができる。こうして、この相互作用は信号の一部の吸収から生ずることができ、次いで出力は出力エネルギーの減少であり、導波路の出力に位置する収集および検出手段により集められる。あるいは、問題の種(分析物本体中に位置するかあるいは導波路の表面上の問題の被膜中に位置するか

し、そして、照明された導波路を血液試料と接触させ、かつ導波路内の光を、溶液本体および導波路の表面上に形成する複合体の単分子層(抗体および第1種を含む)と、同時に、効果的にかつ信号発生的に相互作用させるための測定条件(後に詳述する)を準備すると、信号が導波路の出口に得られ、この信号は励起信号と塊状で相互作用した合計のヘモグロビン(または他の血液因子)と複合体の形成に参加した前記第1種とを同時に表わす。

この場合において、導波路の出口における信号は2つの独立の効果を表わし、そして簡単な手段により解読することができる。なぜなら、全体のヘモグロビンに対する応答は導波路の端から集められる信号出力の即時の部分の励起に相当し(これは実際には前述のバックグラウンドの雑音である)一方導波路に対する応答は抗体および決定すべき第1種の特異的種の前記複合体層の、遅い反応である、形成による時間依存性の信号であるからである。

かかわらず)が入射信号による励起下に蛍光を発生できる場合、相互作用は蛍光を生成することができる。これは例えば蛍光型のフッセイの場合であり、ここで導波装置の表面上に形成しつつある複合体中の相手の1つは、前記複合体の形成下に蛍光を誘発する蛍光体の群からなる。他の方法において、有用な応答は照明された導波路の表面上に構成された大きい分子の膜系体による入射光の散乱から生ずることもできる。

本発明の方法を実施するために、例えば、光学繊維の形あるいは分析物中に溶解した1つの第1種に対して特異性の試薬で被覆されたガラスまたはプラスチックのスライドの形の導波路を使用することができ、ここで分析物は他のあるいはそれ以上の問題の種をさらに含有する。

後に詳述する実施例において、この第1種は他のヘモグロビンまたは血液の因子をも含有する血液の試料中の特定のヘモグロビン化合物であることができる。こうして、この場合において、導波路は第1種に対して特異的の抗体を取り付けて有

そうでなければ、分析物中の2つの特定の因子(例えば、存在するなかでも因子1および因子2)を決定しなくてはならない場合、2つの独立に動く光学的区域をもつ導波路を選択することが好ましく、各区域は決定すべき前記因子の1つに対して特異的な1つの試薬(抗体)を有する。このような場合において、導波路の出力に集められた2つの応答信号(これは導波路が別の出力をすてにもたない場合に当てはまる)は(a)相依存性または(b)周波数依存性である。

場合(a)は2つの独立の光学的素子をもつ導波路により例示され、このような素子の例は分析キュベットの2つの対向する壁であり、前記壁は全反射信号のために光伝導性であり、そして各々は内部が2つの前述の反応成分の1つで被覆されており、各々は分析物中の決定すべき2つの因子(因子1および因子2)の1つに対して特異性である。この場合において、2つの素子は順番に照明され(交互に加えられるパルス)、加えるモードは対応する信号を適切に分離しかつ独立に表示

するために、検出および処理の末端において、同様の目的でも使用される。

場合(a)は、導波路の同一の光路(すなわち、光学的に分離されていない)上の2つの物理学的に分離された区域を含むが、簡単なキャベットにおいて2つの異なる波長であるいは2つの異なる波長における吸収で応答する導波路の構造により例示することができる(これは、例えば、吸収波長において、吸収に応答する1つの区域および蛍光の応答、すなわち、吸収波長と異なる励起波長の信号、を提供する区域を設けることによって実施できる)。この場合において、2つの波長をもつ信号から成る出力の成分は通常的手段(帯域通過フィルターまたは二色ビームスプリッター)により個々の信号に分離する手段をもつ検出装置を準備する。このような場合は、例えば、次のようにして生じさせることができる。すなわち、導波路の第1区域に、分析すべき因子系1に対して特異性の第1試薬を取り付け、この反応生成物の層は光吸収性であり、そして導波路の第2区域に、因子系2に対

して特異性の第2試薬を取り付け、前記第2試薬と因子系2の反応生成物は入射光による励起下で蛍光性である。

もちろん、場合(b)は場合(a)の構造の变形、すなわち、別々に照明される導波路の一方が吸収に対して応答性であり、他方が蛍光応答性である变形、により例示することもできる。

本発明の実験的面を、実験の分析の場合を参照して説明する。第1の場合は血液の分析に関し、さらに詳しくは、血液試料中のヘモグロビンおよび他のヘモグロビン因子、例えば、グリコシル化ヘモグロビン(これは、必要に応じて、この試料中の合計のヘモグロビンに関係づけられる)の直接決定に関する。

グリコシル化ヘモグロビン(HbA_{1c} , A_{1b} および A_{1g})は、糖尿病患者の診断および監視における重要な因子である。合計のヘモグロビン(すなわち、 HbA_0 、グリコシル化されていないヘモグロビン+ (HbA_1))に関する HbA_{1c} の含量(これは合計のグリコシル化ヘモグロビン(HbA_1)の約80%で

ある)の決定はこの病状に関してとくに重要である。

ヘモグロビン A_{1c} は HbA_0 のそれと同一のアミノ酸構造をもつグリコヘモグロビンである; 重要な差は HbA_{1c} のベータ鎖中のN-末端ペリンに対して2,3-ジホスホグリセレートポケット(pocket)中に結合された1-アミノ-1-デオキシフルクトースの存在である。 HbA_{1c} への HbA_0 の修飾は連続的非酵素的後鎖修飾プロセスであり、その速度は血液のグルコース濃度の関数である。グリコシル化は2工程プロセスとして起こる。第1に、グルコースの開いたアルデヒドの形態はHbのベータ鎖の末端アミノ基と反応してシッフ塩基を形成する。第2に、シッフ塩基は次いでアマドリ(AMADORI)転位を行って HbA_{1c} を形成する。中間体のシッフ塩基は不安定であり、 HbA_{1c} の安定なケトアミンよりも60倍大きい解離する(遊離の糖およびタンパク質に)傾向をもつ。血液のグルコースの小部分のみが開いたアルデヒドの形態であり(ほぼ0.001%)かつケトアミンの形成速

度は遅い(が効果的に不可逆的である)ので、 HbA_{1c} の形成は長期間の血液グルコースの濃度の指示である。人間の赤血球の120日の寿命にわたり、グリコシル化Hb分子の数は平均の血液グルコース濃度に対して比例して増加する。平均の血糖グルコースと HbA_{1c} 濃度との間の関係は双特であり、単一の HbA_{1c} の測定は先行する6~8週にわたり血液グルコースの通底的評価である。

HbA_{1c} の測定は炭水化物の代謝の病状、ことに真性糖尿病の監視における非常に有用な道具であることが一般に認められている。糖尿病は高い長期間の糖レベルを有し、これはそれらの HbA_{1c} レベルに反映する。正常の大人は HbA_{1c} として合計のヘモグロビンの約3~6%を有し、これに対し未熟および成熟の初期の糖尿病は HbA_{1c} として6~15%である。 HbA_{1c} 濃度の同様な増加は、遠位のにおよび化学的に誘導した糖尿病をもつマウスおよび豚切除したイヌにおいて認められた。

血液中のグリコシル化Hb、 HbA_1 を決定するために存在するいくつかの方法のうち、とくに

HbA_{1c}の測定は糖尿病の処置を監視するために選択される方法と現存ってきた〔L. ヨヴァノビッチ (JOVANOVIĆ) 他、アメリカン・ジャーナル・オブ・メディスン (American J. of Medicine) (1981) 70, 331; D.E. ゴールドSTEIN (GOLDSTEIN) 他、糖尿病 (Diabetes) (1982) 31, 70; K.H. ガッボイ (GABBOY) 他、ジャーナル・オブ・クリニカル・エンドクリノーロジー・アンド・メタボリズム (J. of Clinical Endocrinology and Metabolism) (1977) 44, 859; B. ゴーネン (GONEN) 他、ダイアベトロジー (Diabetologia) (1978) 15, 1; C.M. ペターソン (PETERSON) 他、糖尿病 (Diabetes) (1982) 31, 1〕。また、次の特許も有用に述べている：米国特許 4,247,553号；英国特許 1,580,318号；米国特許 4,222,836号；米国特許 4,372,747号；米国特許 4,200,435号；米国特許 4,341,635号。これらの方法はグリコシル化されていないHbからグリコシル化Hbを分離するために用いられる機構により容易に分類できる。例えば、イオン交換クロマトグラフィーが初期に用

ロジヤ (Diabetologia) (1981) 21, 579〕を包含する。唯一の型の放射線免疫検定法が報告されており〔J. ジャビッド (JAVID) 他、ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー (British J. of Haematology) (1978) 38, 329〕これは速く（作業に3日以上を要する）そして技術的に複雑であり、放射線領域 HbA_{1c}の調製を必要とする。先行技術の方法は価値を有するが、急速な結果（約15分以内）をもたらし、熟練を必要とせずかつ日常の基準で実施に経費がかからない方法が必要とされている。現在の技術の方法は速く（典型的には結果を得るために1時間以上）、技術的に複雑であり（5回以上のピペット操作の工程を必要とする）そして実験室の環境外に実施に適さない。さらに、現在の方法は合計のヘモグロビンをグリコシル化因子と別に確認することを必要とし、そして両方の分析アーチを実験の一階に確認しかつ適確なく相互に関係づけることが可能であることが望ましいであろう。

特許請求の範囲第9項に要約されているような、

いられ、そしてなお最も普通の方法である〔H.G. クンケル (KUNKEL) 他、サイエンス (Science) (1955) 122, 288〕。このようなイオン交換技術はHbA_{1c}を特定の二測定する現在唯一の利用可能な方法であるが、ある数の制限をもち、それらのうちで温度およびpHの感受性は最も重要である。また、イオン交換は障害にさらされる。なぜなら、不安定なグリコシル化Hb（プレ-HbA_{1c}）をアッセイ前に除去しなくてはならず、そして胎児Hb（HbF）および鎌状赤血球Hb（HbS）は結果を妨害するからである。

他の技術は凍天ゲル電気泳動〔L. メナード (MENARD) 他、クリニカル・ケミストリー (Clinical Chemistry) (1980) 26, 1598〕、等電収束 (isoelectric focusing)〔K.M. スパイサー (SPICER) 他、糖尿病 (Diabetes) (1978) 27, 384〕、比色法、例えば、チオバルビツル酸を用いる〔R. フルキガー (FLUKIGER) 他、FEBS レターズ (Letters) (1976) 71, 356〕および親和性クロマトグラフィー〔V. ブーリオタス (BOURIOUOTIS) 他、ダイベ

トメツの方法は、先行技術の方法の欠点を排除し、そして、必要に応じて、合計のヘモグロビンに対してグリコシル化因子または他のヘモグロビン因子の百分率を直接調べるという利点をさらに提供する。

本発明の方法によると、(Hb)A_{1c}・A_{1b}またはA_{1b}のような種のいずれかに対して特異性の抗体が純粋な形態で入手できるとき、このような種を別々に決定することができる。あるいは、特異性が低い抗体を用いるとき、本発明の方法は2種以上の血球因子、すなわち、例えば合計のHbに関してすべてのグリコシル化Hb、を同時に決定することができる。もちろん、この方法は、また、複合体形成反応における因子に対して特異性の対応する試薬（例えば、HbF、HbSまたは他のヒトヘモグロビン変異種）が入手できる場合、上に述べた以外の血球因子の決定を提供する。

本発明は、先行技術に属するこのような特異的に反応性の複合体種（モノクローナルまたはポリクローナル抗体）を得ることあるいは調製するこ

とに關しないが、本発明に従い分析すべき試料と接触させる活性導波路の調製において、被覆物質としてそれらを使用することに關する。

本発明の方法において使用する導波路は多くの種類のものであることができ、そしていくつかは選択した反応性抗体で導波路を被覆する方法と一緒に係属中の欧州特許出願 (EP-A) 75353 号に開示されている。

本発明の場合において、分析用キャベットの構成員として含まれた板機または線維の光導波路を使用することが好ましく、導波路の被覆された表面を、血液試料がいったんキャベット中に注入されたならば、それと接触させる。

ここで使用する光学技術は、前述のように、主として光の吸収に關する。すなわち、導波路内を伝送される波のエバネッセント成分は、第 1 に周囲の液体中の分子と相互作用し (エバネッセント成分の浸透深さは抗体被膜の厚さを多少越え、これは瞬間的応答を提供する) として、第 2 に、Hb-抗体の複合体と相互作用し、この複合体は、決

定すべき血液因子と導波路の表面上に前もって被覆された特異的複合体部分との反応のため、導波路上に追加の層の形態で蓄積し始める。エバネッセント光成分の相互作用の深さは複合体の層の厚さに実質的に限定されないが、前記蓄積に対する光学的応答は血液自体のため全体の吸収に対して独立であり、そして 2 つの効果は一方または他方の効果から生ずる信号を解釈するために複雑な技術を用いなくて容易に区別できることが、驚くべきことには発見された。

Hb 誘導体はその化学的狀態に依存して特性吸収スペクトルを有する。それゆえ、任意の吸収測定技術を本発明の実施において等しく使用できる [L. テントリ (TENTORI) ら、ヘモグロビン、エンジモロジーに於ける方法において (Hemoglobin, in Methods in Enzymology) (1981), vol. 76, 707-732、アカデミック・プレス (Academic Press)、ニューヨーク]。シアノメトヘモグロビン法および、好ましくは 400 ~ 600 nm、とくに 400 ~ 420 nm および 550 ~ 600 nm の

範囲における、単一または多波長吸収測定アッセイが包含される。また、Hb 分子による吸収が酸素の飽和度に対して独立であるアイソベスティック点法 (isobestic point method) が包含される。

〔発明の具体的な態様の説明〕

本発明およびその例示的な面を、添付図面を参照しながら説明する。

前述のように、光線 1 が角度 θ で 2 つの透明な媒質 n_1 および n_2 の間の界面に衝突するとき (第 1 a 図) (大きい屈折率をもつ媒質 n_1 ($n_1 > n_2$) から衝突)、全内面反射が起こり [N.J. ハリック (HARRICK)、インターナル・リフレクション・スペクトロスコピー (Internal Reflection Spectroscopy)、ウィリー・インターサイエンス (Wiley Interscience)、ニューヨーク (1967)、この時の反射角 θ は次の方程式により与えられる臨界角と呼ばれるある角度 θ_c より大きい:

$$\theta_c = \sin^{-1} (n_2 / n_1) \quad 1$$

反射光線は数字 2 で示されている。この場合において、エバネッセント波は反射表面を越えて屈折率 n_2 の希薄な媒質の中に波長のほぼ一部分の距離 (d_p) だけ浸透する。マクスウエル方程式に従い、反射表面に対して垂直の定常正弦波が密の媒質中に確立される (第 1 b 図)。非吸収性の希薄媒質中へのエネルギーの流れは存在しないが、その媒質中には消散性 (エバネッセント) の非伝搬性場 3 が存在し、その電場の振幅 (E) は表面の界面において最大であり (E_s) として次の方程式に従い表面からの距離 (z) で指数関数的に減衰する:

$$E = E_s \cdot \exp (-z/d_p) \quad 2$$

電場の振幅が表面におけるその値の $\exp(-1)$ に低下するために要する距離として定義された、浸透の深さ (d_p) は、次により与えられる:

$$d_p = \frac{1/n_1}{2\pi(\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2)^{1/2}} \quad 3$$

90° から出発して、 θ が θ_c に近づくにつれて、 d_p は無限に大きくなり、そして固定した角度において、屈折率が合致すると増加する（すなわち、 $n_2/n_1 \rightarrow 1$ ）。また、 d_p は波長に比例するので、波長が長くなると大きくなる。

こうして、透明な導波路の屈折率 n_1 、入射角および波長を適当に選択することにより、 d_p を選択して、界面に近接してあるいはそれから所定の距離において主として物質 4 と、前記距離を越えてわずかに物質 5 と、あるいは応答比を変化されて、4 および 5 の両者と、の光学的相互作用を制御することができる。そして、これは本発明の重要な因子の 1 つであり、すなわち、前記パラメーター（ n_1 、 θ および λ ）の適当に選択して、分析物中の 2 つの独立のパラメーターを、同時に、測定するために最適な条件を得ることを確立することである。

本発明の実施態様において、密の媒質は石英の顕微鏡スライド（ $n_1 = 1.54$ ）で構成することができ、そして希薄な媒質は水性血液試料（ $n_2 \approx$

6.4 mm の活性長さ、0.6 mm の厚さを有しそして、同一の入射角で、明確な光線の反射の合計の数は約 30 ~ 40 の間で変化した。

前述のように、本発明の方法はまた消散（エバネッセント）効果に類する。導波路と液体との界面において発生する蛍光の放射を、また、導波路の出力において監視することができる。相互関係の理論により予測されかつ単分子層〔カルナグリア（CARNAGLIA）およびマンデル（MANDEL）、ジャーナル・オブ・オブテカル・ソサイエティー・オブ・アメリカ（J. Optical Soc. of America）63, 479 (1972)〕および単分球〔リー（LEE）ら、アプライド・オブテックス（Applied Optics）18, 862 (1972)〕の両者において染料分子を用いて立証されたように、導波路／液体の界面における蛍光放射をエバネッセント波として処理できる。事実、エバネッセント波による蛍光の励起は、エバネッセント波の特性をもつ蛍光放射を生成し、こうして蛍光の内部で反射する光線が発生する。この形の蛍光放射の方向は、主としてそれぞれの屈

1.34) であり、そして θ を制御可能に変更させ、これにより λ が選択された可視波長であるとき、最適な応答が得られるまで、 d_p を約 20 ~ 300 nm の間で変化させることができる。もちろん、導波路のために他の材料を 1.54 以外の屈折率で使用できる。

単一の反射システムを使用できるが、エバネッセント波の原理を多直内部反射と組み合わせることにより感度を増大（検出の限界を減少）することができる。反射の数（ N ）は導波路の長さ（ L ）および厚さ（ T ）および入射角（ θ ）の関数である：

$$N = L/T \cdot \sin \theta \quad 4$$

実験のいくつかにおいて使用した顕微鏡スライドの導波路は 3.6 mm の活性長さ、1 mm の厚さを有し、そして入射角は約 60° ~ 75° で変化した。こうして、明確な光線のための 1 つの例における反射の数は径程 6 であった。同様に、繊維の光導波路を用いる他の実施態様において、この装置は

折率の比の関数であり、そして光子の放射が多分路角（ θ_c ）に近い「好ましい」角度の分布を有するという主要な特性（上の CARNAGLIA の文献を参照）を有する。

実際には、このことは蛍光を励起光と同一の光学的平面において導波路の出力において監視可能であることを意味する。理論的には、これは小さい角度の範囲内に蛍光放射の強さを集中させるといふ利点を有する；また、これらの蛍光の光子は溶媒の本体を通過せず、こうして主要な光学的妨害（例えば、吸収、散乱）にさらされない。

この技術は欧州特許出願（EP-A）75353 中で詳述されている。

本発明を例示する蛍光の測定のため、励起波長を 490 nm で選択し、そして光検出素子の前にカット・オフ・フィルターを配置することにより、蛍光放射（510 nm より大きい波長）を導波路の出力において測定した〔 λ_v 8.5 : 3.20 nm において 50 % の透過率；ショット・グラス・ワークス（SCHOTT GLASS WORKS）、マインツ、ドイツ〕。

2またはそれより多いパラメーターを同時に決定できる蛍光技術、例えば、多分析物導波システムは、臨床的診断の分野において、例えば、甲状腺ホルモンT₄およびT₃、ゴナドトロピンLHおよびFSH、腫瘍遺伝標識AFPおよびCEAの同時測定、また臨床微生物学において用いられる細胞表面の抗原の決定の全範囲において、多くの用途をもつ。

用いた装置の1つの実施態様は第2図に概略的に表わされており、ここにおいてブロック図として主要な構成成分が示されている。これらの成分は、モノクロメーター9、光源6、導波路8をもつ流れセル7、および光電子増倍管検出器10、リアンプ11、マイクロプロセッサの光源制御システム12、マイクロコンピュータ13、プリンター14およびメモリー（フロッピーディスク）15を含むデータ獲得および処理用マイクロコンピュータを有する電子工学装置からなる。この場合における光源6はキセノン閃光ランプ（E.G. & G. Salem, MA）であり、そしてモノクロ

メーターは凹形プログラム格子（John-Yoon, Paris, France）を備えて5nmの分解能を可能とした。閃光ランプの作動をマイクロコンピュータ12により制御した。試料を入口18からセル7に注入するため、プログラミング可能な自動ピペット（Hamilton-P; ハミルトン・ボナズ（Hamilton Bonadus）AG, ボナズ, スイス）を好適に使用した。光学的成分は、さらに、2枚の鏡M₁およびM₂と2つのプリズム16および17を含んだ。検出器10の光電子増倍管（R928; 東京、浜松）を導波路の出力に配置して、光の強さの変化を直接監視した。光電子増倍管からの信号を増幅し（11）、閃光時間の間隔分し（12）そして標準の12-ビットのアナログ/デジタル変換器（図示せず）によりデジタルのフォーマットに変換した。会社内で開発したマイクロコンピュータ12は急速な信号の平均化を実施し、そしてすべてのデータをマイクロコンピュータ内に配置された光ダイオード19と参照することにより閃光ランプの強さの変動について測定した。

信号をマイクロコンピュータ13、好ましくはAPPLE II型に、表示および記憶のため、伝送した。導波路の2つの異なる実施態様を使用した：

1つの実施態様として第2図に示す分析用セルまたはキャベットを、顕微鏡のスライドの導波システムに基づく。図解されたシステムは流れセル7を示し、その底は実際に顕微鏡のスライド8である。緊密性をガスケット20により確保する；スライド8を2つの四方形シリカのプリズム16および17、好ましくはヘラエクス（Heraeus）製のものを屈折率が合致する油とともに使用して、直接の光学的接触に配置した。屈折率が合致する油は特別にみがかれた、光学的に平らな導波路の面の必要性を排除した。プリズムは入射光の角度θ（第1図参照）の隅角を容易としかつシール用ガスケット20との光の接触を回避するように設計した。

流れセルは、アルミニウム合金から機械加工により作り、光路に沿った急速な流不含層状流れを可能とする規準を満足した。その設計は、また、

急速かつ精確な分離および再配置を保証した。アルミニウム合金を選択したが、他の合金、例えば、真ちゅうも適する。なぜなら、それは食塩溶液との反応性をもたず、そしてつや消しの黒色に腐蝕性化して透り光の作用を回避した後、低い光学的反射性をもつからである。ガスケット20は厚さ0.5mmの医学的等級のシリコーンゴムであり、そして2kg/cm²の一定の密封圧力下で水密性である。入口18および出口21を含めて、合計のセル容量は1.8mlであり、導波路の真正の容量は0.66ml（53×2.5×0.5mm）であり、そして光路より上の容量は0.29ml（36×1.6×0.5mm）であった。

第2実施態様（第3図参照）は光学繊維のシステムに基づく。繊維の導波路31は、まず標準の伝送光学繊維を120mmの片に切り、次いでシリコーンとテトラフルオロエチレンとのグラッドを除去して120mm²の光学的に活性な区域を露出することによって作った。繊維の末端をみがき、そして支持および保護のために特別に作られたス

タンレンス鋼の末端取付け 32 および 33 (7×3 mm 内径) 内に保持した。繊維の流れセル 34 は開口端の石英管 (内径 4 mm、長さ 80 mm) であり、試料のそり入および取り出しのための入口 35 および出口 36 の管が付加されていた。繊維をシリコンゴム の径 37, 38 をもつ流れセル内の所定位置に配置した。光源 39 からの光をレンズ 40, 41 で繊維の端上に 68° の平均口径角で集束しかつ通過した (第 1 図参照) ; 繊維の出口において、光はレンズ 42 により光電子増倍管 43 上に再集束した。

必須の光学的構成成分が第 4 a 図に概略的に示されている装置は、二重の導波セル 50 からなり、その主要な壁 51 および 52 は源 53 から発生する励起信号を輸送する 2 つの独立に付勢される素子を構成し、そして内側の壁は裸であるか、遮断されているか、あるいは特異性反応成分で被覆されており、セル 50 内に含有されている分析物の溶液と接触している。キャベットの特別に造形された光伝導性壁は、通常的手段により、例えば、

られておりかつ第 2 図の実施態様に関連して開示した対応する構成成分と同一であるので、図示されていない。

他の実施態様 (第 4 b 図参照) において、この装置は前の実施態様のセルと同一の二重導波セル 70 からなり、すなわち、壁 71 および 72 を有し、これらの壁は理解されるように同様に導波路の 2 つの独立の素子として作用しかつ操作される。

この装置は光源 73 を含み、その出力はそれぞれ導波素子 71 および 72 の入口側にレンズおよび鏡 (鏡は数字 74 および 75 で示されている) により各側に集束される。窓の穴 77 をもつチェックパースク 76 は、交互に励起光を素子 71 および 72 に分配する作用をする。次いで、導波路からの出力信号は鏡 79 および 80 により検出器 78 へ向けられる。

第 4 a 図および第 4 b 図に描かれている両者の実施態様において、導波素子の一方 (51, 71) は分析物中の測定すべき 1 つの成分に対して特異性の抗体で複合化反応 (前述した) により被覆さ

れている透明なプラスチック、例えばルーサイトで成形することにより形成することができる。これらの壁は屈折率が同一であるかあるいは異なる材料から作ることができる。

源 53 から発生する光線 54 は、交互に、回転チェックパースク 57 a, b により光線 55 および 56 に分割される。第 4 a 図において、この鏡 57 は 2 つの位置で動かされており、1 つの遮蔽された位置は数字 57 a に相当し、そして他の位置 (第 1 位置に対してほぼ直角である) は数字 57 b に相当する。容易に理解されるように、鏡 57 の位置に依存して、光線 54 は光線 55 に反射されるか、あるいは光線 56 に伝搬される。こうして、源 53 からの光はそれぞれ鏡 58 a, b, c および 59 a, b および e の一列の 1 つにより、二重導波セル 50 の位置 51 および 52 に交互に注入される。次いで、導波路壁の部分からのそれぞれ出力光 60 および 61 は検出器 62 上に集められる。

この実施態様の残りの構成成分は、技術的に知

れているが、第 2 素子 (52, 72) は被覆されないままである。ここで、被覆されないのは抗体をもたない表面を意味する。しかしながら、この表面上のタンパク質吸着部位は通常この表面上にタンパク質 (例えば、BSA) を吸着させることにより遮断されている。したがって分析の間、被覆されない区域の出力に集められる信号は励起光線と分析物の本体との相互作用を反映する。すなわち、それは試料中の合計のヘモグロビンについての所望の情報を提供する。しかしながら、同時に、導波路の被覆された側から出る信号は、セルのこの側の内表面上に被覆された特異的反応成分により結合されつつある成分についての要求する情報を提供する。これはこの出願の実施例 4 を参照して詳述されている。ここでは次のように述べることで十分であろう。すなわち、この種類の導波システム (二重型) は、導波路の別々の区域から 2 つの型の情報を集め (すなわち、前の実施態様におけるような重ねられた現象はもはや存在しない) これにより決定においていっそうすぐれた精度を

得ることができる。

変形の実施態様は第 4 図に表わされている。この変形において、前述のセル 50 および 70 と同一の全体的構成の二重の導波セル 90 を使用し、ここで差具は末端 91 a および 92 a が実際に、例えば銅を用いる金属化(鍍)により、反射性とされていることである。したがって、導波光伝導性素子のそれぞれ他端 91 b および 92 b は同時に入力端および出力端として作用する。これは 2 つの光源 93 および 94 により提供される励起光線の通路で例示され、これらはそれぞれ交差ビームスプリッター 95 および 96 の後に端 91 b および 92 b へ向けられる。こうして、端 91 b および 92 b に入る光は導波素子を通してまず前方に、次いで端 91 a および 92 a で反射された後後方に移動する。この構成により、励起光の分析物との相互作用の能力は前に開示した実施態様に比較して実際に 2 倍となる。この変形は、さらに、検出器 97 を含み、この検出器 97 は 91 b および 92 b から出て、そしてビームスプリッター

95 および 96 および三角形の鏡 98 によりそれらに向けられる後方への信号を集める。源 93 および 94 は交互に同期化されるので、導波装置の端 91 b および 92 b から出る信号パルスは検出器 97 に同時に到達しない。

第 5 図は、前に開示したような二重導波型のセル内の分析の間に起こる現象を、分子レベルで図解する略図である。第 5 図において、51 および 52 で示す区域は、例えば、第 4 図に描かれた導波素子 51 および 52 に相当する。区域 51 および 52 の間の中間区域は、分析媒質を概略的に表わし、種がその中に溶解しており、そして反応成分または種は素子 51 および 52 の内壁上に取り付けられている。素子 51 は 101 で示す HbA_{1c} 。実在物に対して特異性の抗体 100 をその上に付着してすることが描かれている。これらの HbA_{1c} 分子のあるものは特異性の抗体 100 と複合化した後の状態で示されており、他のものはまだ遊離の状態である。他方の表面(すなわち、素子 52 の表面)は遮断剤 102 (例えば、ウシ血清アルブ

ミン)で被覆されており、この遮断剤は溶液中の他の種、例えば、 HbA_0 103 および任意の型の他のタンパク質 104 に対する種の種の存在しうる親和性を最小とすることを意図している。

こうして、分析の間、表面 52 に対する Hb の特異的結合は防止され(あるいは少なくとも強く最小とされ)、こうして 52 中を移動する信号のエバネッセント波成分と分析物との相互作用により、表面上に付着した遮断性被覆の深さを感えた際において、全体のヘモグロビンを測定することが可能となる。

これと対照的に、表面 51 上でその上に被覆された抗体分子 100 と分析物溶液中の HbA_{1c} (AG) との間の複合化反応が起こる。この反応は急速ではない。したがって、導波路のその素子中を移動する光成分との連続的な対応する相互作用とともに、複合体の層が漸進的に表面 51 上に蓄積する。これにより、第 6 図に描かれた A または B 型の応答曲線が得られる(下の実施例を参照)。

試験を実際に実施するために、顕微鏡のスライ

ドを濃硫酸および蒸留水、エタノールおよびアセトン中に、標準のスライド着色ガラス器具を用いて、連続的に浸漬することにより洗浄した。根絶をエタノール中で超音波処理により洗浄し、そしてガラス棒上に支持し、種々の抗体溶液中に浸漬した。抗体は導波装置の表面に物理的に吸着されるか、あるいは共有結合した。吸着は洗浄された導波路を抗体の溶液(5 滴のタンパク質/ml の 0.05 モル/l のトリス (Tris) Hec 緩衝液、pH 7.0)と一緒に 1 時間インキュベーションすることによって実施した。吸着しないタンパク質を食塩溶液 (Saline) で洗浄除去し、そして残りのタンパク質結合性部位を抗体被覆した導波路をウシ血清アルブミン(トリス緩衝液中 1.0 重量%)とともにインキュベーションすることによって遮断した。この結合法は酸性水性シラン化環境においてアミノプロピルトリエトキシシラン APTS (固定化生化学物質および親和性クロマトグラフィー (Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography), R.B. ダンロップ (Dunlop),

プレナム・プレス (Plenum Press), ニューヨーク, 191-212 ページ) を含むウィットール (Westall) の方法と本質的に同一であった。〔固定化酵素、抗原、抗体およびペプチド：調製およびクロマトグラフィー (Immobilized Enzymes, Antigens, Antibody and Peptide: Preparation and Chromatography), エンジモロジー (Enzymology), H.A. ウットール (Westall), マーセル・デッカー・インコーポレーテッド (Marcel Dekker Inc.) ニューヨーク 1975, 1-48 ページ)〕。

一般に、導波路を APTS ($0.4 \text{ モル}/\ell$) と 80°C において 3 時間反応させた。次いでスライドまたはキャベットの壁を 120°C におよび縦線を 100°C に 2 時間加熱し、次いでリン酸緩衝液 ($0.1 \text{ モル}/\ell$, $\text{pH } 6.8$) 中のグルタルアルデヒド溶液 ($0.5 \text{ モル}/\ell$) 中でそれらを周囲温度において 90 分間ソーキングした。この「活性化された」導波路を、次いで抗血漿 Ab (5 ng のタンパク質/ ml のリン酸緩衝液) と 4°C において 24 時間反応させた。抗体が結合した導波路をリン酸緩衝

精製されたヘモグロビン A(HbA) をセルバ・フェインバイオケミカル (SERVA FEINBIOCHEMICA, ハイデルベルグ, FRG) から入手した。ウシ血清アルブミン (BSA) をシグマ・ケミカル・カンパニー (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA) から入手した。緩衝液および溶媒のすべての化学物質は、メルク (MERCK, Darmstadt, FRG または BDH, Poole, Dorset, UK) から入手した分析精製または試薬級のものであった。ヒト HbA に対するウサギ抗血清は DAKO (DAKO, Copenhagen, Denmark) から購入した。

導波路はヘラエウス・クアルズシュメルズ (HERAEUS QUARZSCHMELZE GmbH, Hanau, FRG) から入手した溶融シリカの顕微鏡スライド (Suprasil 1 $75.0 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$) であった。

スライドを連続的に濃硫酸、蒸留水、エタノールおよびアセトン中に浸漬 (各 10 分) することによって清浄した。清浄なスライドをリン酸緩衝液食塩溶液 (PBS; $0.1 \text{ モル}/\ell$ リン酸塩, $\text{pH } 7.4$, 0.9% (w/v) NaCl) 中の 5 倍希釈の抗 HbA の溶液中で 1 時間インキュベーションすることに

液中で洗浄した後、等張食塩溶液 ($0.14 \text{ モル}/\ell$, ナトリウムアジドを含有する, $8 \text{ ミリモル}/\ell$) 中で 4°C において保存した。結合の前および後にタンパク質の測定〔アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.) 51, 654-655 (1973)〕は、タンパク質の吸収が石英 1 cm^2 につきほぼ 1 ng であることを示した。

〔実施例〕

次の実施例により、本発明をさらに詳しく説明する。

実施例 1

次の 2 つの光学的現象を明らかにするため：

i) エパネッセント波成分と全体のヘモグロビンとの相互作用

ii) エパネッセント波成分と形成しつつある Ag/Ab 複合体との相互作用

使用した装置は第 2 図の実施態様のそれであった。

既知のヘモグロビン溶液を用いる標準の調製。

よって、抗体を表面に被覆した。蒸留水中ですすいだ後、残りのタンパク質結合部位を PBS 中の 1% (w/v) の BSA とともに 1 時間インキュベーションすることによって遮断した。次いで、スライドを蒸留水中ですすぎ、使用するまで、 4°C において等張食塩溶液中で保存した。

スライドを第 2 図に示す、第 1 実施態様に、光がスライド中に具る角度 θ で結合するような方法で、しっかり固定した。洗剤セル 7 を表面に 0.5 mm のシラスタティックガスケツト 20 を介して固定し、そしてセルを通してフッセル緩衝液 (PBS + 5.0% (w/v) の BSA) を送入することによって気泡を系からバージした。標準の Hb 溶液 (1.0 , 0.5 , 0.1 , $0.05 \text{ ng}/\text{ml}$) をフッセル緩衝液中で構成して、 5 ng の合計タンパク質/ ml の最終タンパク質濃度にした。

フッセル手戻は 3.5 ml の標準 Hb 溶液をセルの中に、蒸留水の確立後、注入することによって開始した。入力光線の波長は 410 nm においてモノクロメーターを調節することによって選択し、そ

して反応を410 nmにおける強度の減少により監視した。角度 θ をまず66°(臨界角)より上でランダムに選択した。約67°の値を下に報告する試験において使用した。

連続的に抗体被覆したスライドを使用し、1.0 (曲線A)および0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ (曲線B)のHb標準を用いて得られた抗体結合曲線を第6図に示す。着染の確立後、標準を t_1 に於いて注入し、そして伝送の直ちに低下(I_1, I_2) (任意の単位)をゆっくりであるが、なお遅い結合現象により追跡し、この現象は次の10分にはわたって続いた。初期の低下はエバネッセント波の D_p 範囲内で光学的に吸収性の遊離ヘモグロビンのためであった(第1図参照)。この早い段階において、複合体は形成し始めることに注意されたい；したがって、エバネッセント波成分は初期のAb被覆をきわめて有意に延ばし、そして本体の溶液と自由に相互作用する。時間 t_1 における速度 K および大きさ、それぞれ、 M_1 および M_2 の信号の引き続く遅い変化は、表面におけるHbの抗体結合のためであった。

実施例2

抗体被覆スライドを所定位置にし、Hb標準溶液を洗剤セル中に注入した。10分間反応させた後、結合しない物質をアッセイ緩衝液で洗浄除去した。結合した物質を410 nmにおける透過の減少により監視した。光の入射角の効果は角度(θ)を64°から78°の間で変化させて研究した。臨界角(θ_c)は66°である。結果を入射角に対して透過の減少 δ (=感度)としてプロットした(第7図)。これから理解できるように、Hbの抗体結合のこの系の測定は66°~70°の間の角度で可能であり、68°付近において最適である。角度が大きくなるほどこの場合透過率は小さくなり過ぎるが、このような角度は異なる種類の分析系に適合することがあるであろう；角度が小さくなると、反射が起こらなくなる。66°~68°の角度は適切に劣る。なぜなら、光線がある角度で広がり、光が部分的に反射しかつ部分的に屈折し、後者の部分は系から失われるからである。

以下余白

これはAb被覆を用いない図示しない対照実験にかいて示された。

次いで、セルをアッセイ緩衝液で洗浄し(t_1)、これにより結合しない物質を除去した。信号の残りの絶対的变化(WA, WB)を、下表に示すように投与量に關係づける。

信号の絶対的变化

	試験	反復試験	平均
投与量	1	2	
Hb ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
0.1	-4.6%	-4.3%	-4.3%
1.0	-14.9%	-12.5%	-13.7%

標準曲線AおよびBは、血液の未知の試料中のヘモグロビンの決定(determination)のための型(template)として有用であった。同様に再視可能な情報を、未知の試料が一定時間 t_1 後に測定されるかぎり、測定値 M_1 および M_2 から収集することができた。

実施例3

より繊細な標準曲線の作成Hb標準溶液を別の抗体被覆したスライドとともにインキュベーションし、そして最適角度として θ =約68°を用いて反応を監視した。透過率 δ として表わした結果は、抗量-応答の関係を示す：

標準 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	透過率 δ
1.0	87.2
0.5	94.0
0.1	94.4
0.05	95.3
0	100

この系の最小検出は約0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ すなわち0.1 g/l である。正常の大人のHbA値は135~175 g/l であり、正常のHbA_{1c}レベルは4~9 g/l であり、こうしてこの方法は適切な感度で $\times 10 \sim \times 100$ の希釈で用いることができる。

以下余白

実施例 4

異質ヘモグロビンの存在下のヘモグロビンの測定

溶液の試料を、鳥類のヘモグロビン(ハト)に基づきかつ測定すべきヒトヘモグロビンを变化する比率で含有するようにして調製した。両者のヘモグロビンの合計は通に 5 mg/ml であり、そしてヒトヘモグロビンの比率を下表に記載する。第 4a 図および第 4 b 図に示す面の二重導波路を使用し、表面の一方(例えば、5 1)をヒト Hb に対する抗体で被覆した。他方の表面(5 2)をウシ血清アルブミンで通常のように通断した。

測定を実施するとき、7.5.3 % の透過率に相当する低い低下(I)すべての場合に測定された：次いで透過率のそれ以上の低下(M)(実施例 1 および第 6 図を参照)が 10 分の間隔後に記録された。鳥類のヘモグロビンのみを含有する試料の場合において、10 分の間隔の間それ以上の変化は観察されなかった。結果を下に要約する。

以下余白

実施例 5

ヘモグロビンの存在下のグリコシル化ヘモグロビン(HbA_{1c})の測定

ブールシヘパリン化した全血から、Bio-Rex 70 樹脂(バイオラッド(BIO-RAD), リッナモン D, カルフォルニア州米田)を使用するカチオン交換クロマトグラフィー(LA, トライベリ(TRIVELLI)ら、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New England J. of Medicine) 284 (1971), 353)により、標準のグリコシル化 Hb(HbA_{1c})を調製した。次いで、精製した HbA_{1c} を使用して、それを变化する既知量でグリコシル化ヘモグロビン不含血液と再び組み合わせることによって、標準試料を調製した。試料中の合計のヘモグロビンに関する HbA_{1c} の濃度は 1 ~ 2.0 重量 % の間で变化させ、そして合計の Hb 濃度は 15.0 g/l 程度であった。

第 4 b 図に図解するよう二重導波路を含むキャベットを有する分析装置を決定に使用した；キャベットの一方の側の内表面を HbA_{1c} に対して特

鳥類の Hb 中の ヒト Hb (%)	透過率(%) (10 分後)	M
0	75.3	0
1	74.9	0.4
2	74.4	0.9
10	72.0	3.3
20	68.3	7.0

こうして、最初の初期の低下 I について記録された値は存在する合計のヘモグロビンに関係づけることができ、一方 10 分の反応期間後に観察されたヒトヘモグロビン因子の表面 5 1 上に被覆された抗体への結合に相当する値(M)は試料のヒトヘモグロビン含量および合計のヘモグロビンに対するその比に関係づけることができる。この実施例において使用した装置に結合した自動記録装置に上のデータを記録することにより、標準曲線をつくった。その後、このような曲線は鳥類ヘモグロビン中のヒトヘモグロビンの未知の混合物の決定のための比較データとして使用した。

以下余白

異性の抗体で被覆し、一方反対側の表面はそのまゝにしておいた。各セルの含量(各標準の連続的試験に新しいものを使用した)は約 1 ml であり、そして約 0.9 ml の PBS と一緒に 0.1 ml の測定すべき標準をピペットで入れた。第 8 図は 15 分のインキュベーション時間(20 % の HbA_{1c} 試料を用いる)後に得られた測定曲線の 1 つを示し、上の曲線(ほとんど平坦)は導波路の被覆されない部分で記録されたものであり、そして下の曲線は導波路の抗体で被覆された部分の応答を示す。

種々の標準の分析結果を下表にまた記載する。

試験した 標準溶液 (HbA _{1c} %)	導波路中の透過率(%) 被覆しない側	被覆した側	差 M (%)
0	56.1	55.8	0.3
1	55.5	54.7	0.8
5	55.7	50.2	5.5
10	58.0	49.2	8.8
20	54.9	42.4	12.5

ゼロのHbA_{1c}の試料についての0.3%の差は、グリコシル化血漿糖質に対するHbA_{1c}特異性の抗体のある程度の親和性を示しうる。しかしながら、この因子は実際の分析条件下で無視することができ。

導波路の被覆しない部分における透過率は1つのセルから他のセルに於いて一定ではなく、これはこの方法が合計のHbの精度な決定のために適当ではないと思われることに、また、注意すべきである。しかしながら、この場合において合計のHbを測定することは不必要であり、かつまた被覆されない部および被覆された部からの信号を関係づけることは不必要である。第2に、一連のキャベットの各々がこの装置の初期の目盛定めを行なわないで絶対的測定値を完全に再現できるように、このようなキャベットの手による製作を一定に維持することは困難である。概に、キャベットが大規模に工業的に成形により製作されるとき、この欠点は克服される。

以下余白

BIOPRODUCTS, Brussels, Belgium)を一様に溶解することによって調製した。標準糖質として使用した緩衝溶液は、リン酸塩緩衝液であった：0.05モル/l (pH 7.4)；0.9%のNaCl (w/v)；0.05%のNa₂S₂O₅ (w/v)；フイーン20 (SIGMA) 0.1% (v/v) および2% (v/v)の正常ヒツジ血清 (SAPV)。

この実験において開示する試験は、「サンドイッチ」型のアッセイを行うことに基づく。すなわち、キャベットを標準と接触させ、そしてインキューションを一定期間実施して、表面(A)および(B)に取り付けられたそれぞれの特異的抗体へ抗原を十分に結合させた。このインキューション時間は精度に測定した10分の期間であり、その期間に全体の結合した抗原の量は標準中のその濃度に比例した。ブランク(0%の抗原試案)に対する試験を同じように実施した。

その後、セルを空にし、結合しない物質のすべてを洗浄除去し、そして導波装置の表面に取り付けられた抗原に対する第2抗体の組み合わせた溶液を加えた。この組み合わせた溶液は、フルオレ

実施例6

蛍光型アッセイによるヒトIgGおよびヒト血清アルブミン(HSA)の同時定量

前の実施例におけるような二重導波路を使用し、490 nmの入射輻射を遮断しそして520 nmの蛍光信号を通過させるカットオフフィルターを検出器78の前に光路中に入射した。

第2回路に関連して開示した型のモノクロメーター(9)により励起光を発生させた。

二重導波路としてはたらくキャベットの1つの表面(A)を、IgGに対してヒツジでレイズ(raise)した抗血清で被覆した。これは抗血清の希釈溶液を用いる通常の手段に従って、数層により実施した(α-鎖特異性；SAPU, Carluka, Scotland；容量1/400の希釈)。キャベットの対向する壁(B)を同じ技術に従いHSAに対するヒツジ抗血清(1/100容量の最終希釈、同一の手段)で被覆した。

次いで、混合した組み合わせ標準溶液をヒトIgG(SERVA BIOCHEMICALS)およびHSA(UCB-

セインで被覆付けた1/40 (v/v)緩衝液希釈のウサギ抗HSAおよびウサギ抗IgG (DARO IMMUNOGLOBULINS から入手した)を含有した(フルオレセインイソシアネート、FITCを通常の手段に従い実際のマーカーとして使用した)。

蛍光被覆付けた混合抗体溶液を加えると、瞬時的な蛍光の上昇が導波装置の出力において観測され、次いで遅い速度依存性信号が観測され(第9図参照)、所定期間後のその高さは独立に取ったIgGおよびHSAの標準濃度に比例した。解読後、表面(A)および(B)から生ずる信号の成分を別々に表示し、そして結果を下表に記載する。

標準のIgG およびHSA の濃度 (mg/ml)	表面Aからの応答 (任意の単位)			表面Bからの応答 (任意の単位)		
	試験	反復	平均	試験	反復	平均
0.1	1	2	1.5	-1	2	1
1.0	27	24	25	44	44	44
10.0	64	61	62	60	56	58
100.0	160	170	165	140	135	137

第9図は、成分AおよびBについて、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ （破線）および $10\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ （混合線）の標準の場合における0～15分の状態をグラムで示す。実験はブランクを表わす。

上の実施例におけるように、未知の濃度でIgGおよびHbAを含む試料を同じように試験しかつ標準と比較することにより確認した。

4. 図面の簡単な説明

第1a図は、屈折率 n_1 の媒質（導波路）内の完全に反射した光の伝搬を説明する線図であり、 n_2 は導波装置が接触している他の媒質（分析物）の屈折率 n_2 より大きい。

第1b図は、第1a図に付随し、そして希薄な媒質（分析物）中のエバネッセント波成分の浸透を概略的に表わす。

第2図は、本発明の方法を実施するための単一の導波路の概略的配置図である。

第3図は、本発明の方法を実施するための装置の他の実施態様の略配置図である。

第4a図は、二重導波セルを含む分析装置の他

の実施態様の細部の略上面図である。

第4b図は、第4a図の実施態様の変形の略図である。

第4c図は、なお他の実施態様の略図である。

第5図は、本発明の方法に従う分析の間に生ずる現象の時表示である。

第6図は、本発明の1つの実施態様に従う分析を実施するときの応答曲線を示す線図である。

第7図は、導波装置を通して移動する多重反射光線の入射角 θ の関数として、応答曲線の1つのパラメーターの変動を示す線図である。

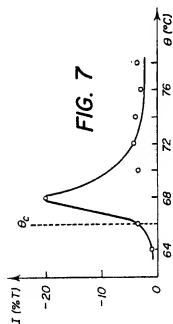
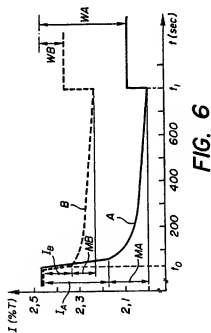
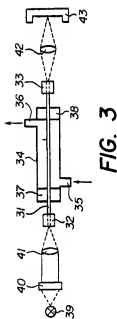
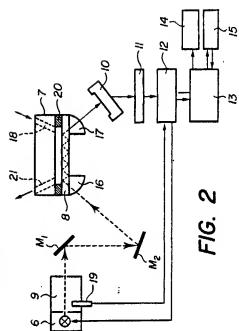
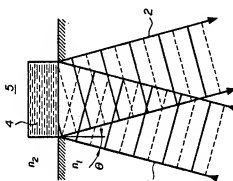
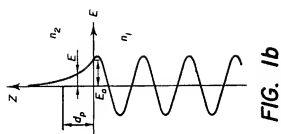
第8図は、ヘモグロビンの存在下のHbA_{1c}の分析における典型的な応答曲線の線図である。

第9図は、重光を含む他の型の分析を示す。

1…光線、2…反射光線、4、5…物質、6…光源、7…流れセル、8…導波路、9…モノクロメータ、10…光電子増倍管、11…リアンプ、12…制御システム、13…マイクロコンピュータ、14…プリンタ、15…メモリー（フロッピーディスク）、16、17…プリズム、18…

入口、20…シール用ガasket、31…導波路、34…流れセル、35…入口、36…出口、37、38…栓、39…光源、40、41、42…レンズ、43…光電子増倍管、50…導波セル、51、52…壁（素子）、53…源、54、55、56…光線、57、58、59…鏡、60、61…出力光、70…二重導波セル、71、72…導波素子、73…光源、74、75…鏡、76…チャペーディスタ、77…窓、78…検出器、79、80…鏡、90…二重導波セル、93、94…光源、95、96…交差ビームスプリッター、97…検出器、98…プリズム、100…抗体、101…HbA_{1c}、102…遮断剤、103…HbA₂、104…タンパク質。

以下余白



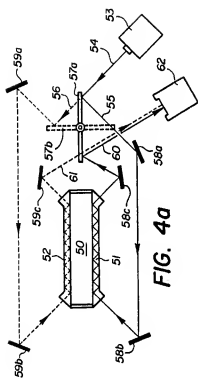


FIG. 4a

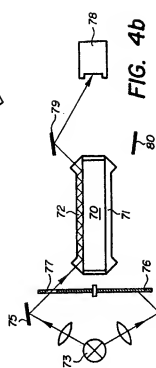


FIG. 4b

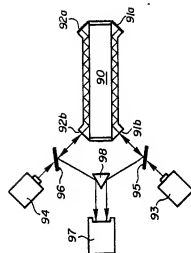


FIG. 4c

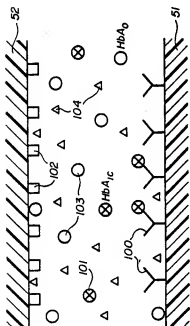


FIG. 5

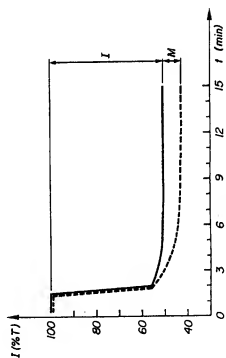


FIG. 8

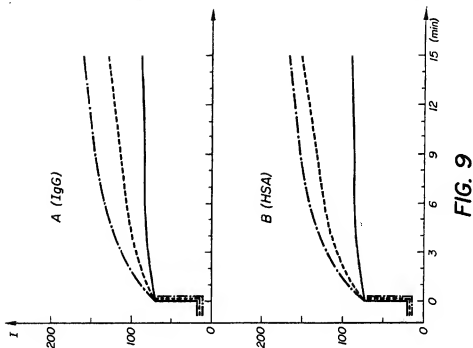


FIG. 9

手続補正書(方式)

昭和61年3月12日

特許庁長官 平賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第276144号

2. 発明の名称

液状分析物中の種のパラメータを
光学的に確認する方法および装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 バテル メモリアル インスティテュート

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 井理士 (6579) 青木

(外4名)

之青井
本理士
印願士

5. 補正命令の日付

昭和61年2月25日(寛達日)

61.3.12

6. 補正の対象

明細書

7. 補正の内容

明細書の序言(内容に変更なし)

8. 添附書類の目録

序言明細書

1通